

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalisator dalam proses biokimia. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi sampai 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada tanpa menggunakan katalis (Poedjiadi dan Supriyanti., 2006). Enzim dihasilkan oleh organ-organ pada manusia, hewan, tanaman, maupun mikroorganisme yang secara katalitik menjalankan berbagai reaksi, seperti hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer radikal, pemutusan rantai karbon.

Berdasarkan tipe pemutusan ikatan glikosidiknya, enzim 1,3- β -glukanase termasuk enzim 1,3- β -glukanase yang menghidrolisis ikatan 1,3- β -glikosidik pada 1,3- β -glukan (seperti laminarin dan *pachyman*) (Lafond *et al.*, 2012). Enzim 1,3- β -glukanase terbagi menjadi dua jenis yaitu ekso-1,3- β -glukanase dan endo-1,3- β -glukanase. Enzim ekso-1,3- β -glukanase menghidrolisis ikatan β -1,3-glukan secara berurutan dari ujung non-reduksi suatu polimer atau oligomers, sehingga dihasilkan glukosa. Sedangkan enzim endo-1,3- β -glukanase memutuskan ikatan β -glukan pada bagian yang acak pada sepanjang rantai polisakarida dan melepaskan oligosakarida sebagai produk hidrolisis (Peng *et al.*, 2011).

Beberapa manfaat enzim β -glukanase diantaranya dalam bidang industri, kesehatan, pertanian, dan peternakan. Pada bidang peternakan enzim β -glukanase bersama xylanase telah digunakan sebagai bahan tambahan pakan yang mempunyai kemampuan untuk meningkatkan berat badan ayam. Enzim β -glukanase menurunkan efek anti-nutrien dan meningkatkan pertumbuhan serta efisiensi pakan dari ayam broiler yang diberi pakan berbasis sereal, seperti gandum, *oat*, dan *barley* yang memiliki kandungan utama -glukan (Zarghi., 2018). Enzim 1,3- β -glukanase digunakan sebagai enzim untuk sakarifikasi dalam proses pembuatan biofuel dari limbah daun jagung (*Zea mays*) dan rumput abadi *Mischantus* (*Mischantus x giganteus*) yang

memiliki kandungan 1,3- β -glukan mencapai 2% dan 5% dari total biomassa (Falter *et al.*, 2015). Aplikasi -glukanase dalam industri bioteknologi digunakan untuk proses preparasi protoplas dari fungi, bakteri dan sel tumbuhan, untuk mendegradasi limbah pertanian, industri dan pemrosesan kopi serta sebagai bahan aditif dalam detergen dan agen *bio-control* untuk melindungi tanaman dari hama penyakit (Edison & Sugathan., 2018).

Dalam bidang pertanian,enzim 1,3- β -glukanase dapat berperan sebagai pengendali hama dan penyakit pada tanaman yang disebabkan oleh jamur.. penyakit yang disebabkan oleh jamur sangat mematikan dan menyebabkan kerusakan inang yang parah (Fisher *et al.*, 2012). Enzim β -glukanase umumnya dikenal sebagai protein terkait patogenesis yang menghancurkan patogen jamur dengan membelah polisakarida β -glukan. Endo- β -1,3-1,4-glukanase yang dihasilkan oleh *Paenibacillus polymixa* strain A21 telah menunjukkan aktivitas yang signifikan terhadap *Botrytis cinerea*. Aktivita anti jamur terbukti meningkat dengan kloning dan ekspresi gen glukanase dari *P. Polymixa* strain A21 (Edison & Sugathan., 2018).

Dalam bidang kesehatan, enzim 1,3- β -glukanase berguna untuk mendegradasi 1,3- β -glukan pada biofilm yang dihasilkan oleh *Candida albicans*. Biofilm adalah kumpulan sel mikroba yang berasosiasi secara *irreversible* (tidak dapat berpindah) dengan permukaan dan tertutup oleh matriks ekstraseluler yang umumnya terbuat dari polisakararida (Pierce *et al.*, 2017). *C. albicans* dapat tumbuh tidak terkendali (*overgrowth*) dan membentuk biofilm apabila berada dalam keadaan terancam, misalnya karena keberadaan logam berat dan kekurangan nutrisi (Kurniawati., 2019). Adanya pembentukan biofilm *candida* menyebabkan pengobatan kandidiasis tidak berlangsung dengan sempurna. Biofilm *candida* menunjukkan aktivitas resistensi terhadap antimikroba dan antifungi serta dapat melindungi diri dari sistem imun inang. Dinding sel *C. albicans* terusun oleh kitin (0,6-9%), β -glukan (1,6- β -glukan dan 1,3- β -glukan) (50-60%), dan mannoprotein (30-40%). Penyusun utama biofilm adalah 1,3- β -glukan yang juga berperan terhadap resistensi biofilm (Nett *et al.*, 2007).

Enzim 1,3- β -glukanase disandi oleh gen *MKAFGlu*, merupakan gen yang berhasil dikloning dan dikarakterisasi dari pustaka metagenomik saluran pencernaan *Achatina fulica*. Gen *MKAFGlu1* mengkode protein berupa enzim 1,3- β -glukanase yang berhasil diekspresikan di *E.coli* (Kurniawati., 2019). Untuk ekspresi pada tingkat yang lebih tinggi, gen ini berhasil dikonstruksi pada plasmid rekombinan [pPICZ A – *MKAFGlu1*]. Kemudian diekspresikan di organisme eukariot *Pichia pastoris* KM71H (Umam., 2019).

Ragi metiloprotik *Pichia pastoris* telah banyak dikembangkan sebagai salah satu inang untuk ekspresi protein dalam produksi protein rekombinan dengan level tinggi digunakan dalam penelitian struktur genom dan bioteknologi. *Pichia pastoris* juga dapat tumbuh dalam media yang mengandung metanol sehingga menurunkan resiko kontaminasi oleh mikroba lain (Careghino and Cregg., 1999).Keuntungan ekspresi menggunakan *Pichia pastoris* dibandingkan dengan yang lain adalah sistem ekspresi ini menggabungkan keuntungan penggunaan *E.coli* (tingkat ekspresi tinggi, skala produksi dapat dilakukan dengan mudah dan murah) dan sistem eukariota lainnya (adanya komponen pelipatan protein dan modifikasi pasca-translasi). Karena fleksibilitasnya ini sistem ekspresi *Pichia pastoris* banyak digunakan dalam riset laboratorium untuk aplikasi industri (Glick dan Pasternak., 2003). Kelebihan lainnya adalah *Pichia pastoris* mempunyai kemampuan untuk mensekresikan *native protein* miliknya sendiri dengan level sangat rendah pada medium tumbuh minimal sehingga protein total yang tersekresi sebagian besar adalah protein rekombinan. Dalam hal ini dapat membuat pemurnian protein tersekresi dapat lebih mudah untuk dilakukan (Barr *et al.*, 1992).

Pada penelitian ini dilakukan pemurnian enzim 1,3- β -glukanase yang diekstraksi dari *Pichia pastoris* KM71H rekombinan dengan fraksinasi ammonium sulfat dan pemurnian menggunakan kit Ni-NTA. Pemurnian dilakukan untuk memisahkan enzim dari protein ataupun pengotor lainnya agar enzim dapat digunakan untuk riset, biasanya untuk mempelajari aktivitas enzim, struktur dan fungsinya.

Pemisahan protein (enzim) dengan cara pengendapan fraksional dengan ammonium sulfat bertujuan untuk meningkatkan kadar protein (kemurnian) dalam fraksi dari campuran kompleks. Penggunaan ammonium sulfat dalam pengendapan protein untuk proses pemurnian dengan cara *salting out* karena memiliki kelarutan tinggi di dalam air, relatif murah (Wang., 2004), memiliki kekuatan ionik yang cukup tinggi, tidak menimbulkan kerusakan pada protein dan memiliki efek penstabilan pada beberapa enzim (Chaplin., 2004).

Pemurnian protein dapat juga dilakukan dengan kolom kromatografi afinitas resin Ni-NTA. Pada ujung protein plasmid rekombinan terdapat 6x histidin yang akan berikatan dengan logam nikel pada resin. Ikatan antara histidin dengan nikel dapat dilepas dengan penambahan imidazol berkonsentrasi tinggi pada resin. Agarose Ni-NTA banyak digunakan untuk purifikasi protein karena mempunyai afinitas tinggi dan selektivitas untuk protein rekombinan yang ditandai dengan 6 residu histidin.

1.2. Rumusan Masalah

1. Berapakah aktivitas spesifik enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1 hasil pemurnian dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat?
2. Berapakah aktivitas spesifik enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1 hasil pemurnian dengan kolom Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA)?
3. Bagaimana peningkatan faktor kemurnian enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1 pada proses pemurnian parsial dengan fraksinasi ammonium sulfat maupun pemurnian dengan kolom Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA)?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas spesifik enzim 1,3- β -glukanase hasil pemurnian dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat.
2. Menentukan aktivitas enzim 1,3- β -glukanase hasil pemurnian menggunakan kolom Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA).
3. Menentukan peningkatan faktor kemurnian enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1 pada proses pemurnian parsial dengan fraksinasi ammonium sulfat maupun pemurnian dengan kolom nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA).

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aktivitas spesifik dan peningkatan faktor kemurnian enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1 setelah dilakukan pemurnian parsial menggunakan fraksinasi ammonium sulfat dan pemurnian dengan kromatografi afinitas menggunakan kolom Ni-NTA. Penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri